

UNIVERSIDAD: Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales.

NÚCLEO DISCIPLINAR: Productos Naturales Bioactivos y sus Aplicaciones.

TÍTULO DEL TRABAJO: IDENTIFICACIÓN DEL MECANISMO DE TOLERANCIA A ETILENO EN LÍNEAS RECOMBINANTES DEL CROMOSOMA 6A DE TRIGO.

AUTOR/ES: Ing. Agr. Mirna de los Milagros Ricciardi; Ing. Agr. Mónica Collado; Ing. Agr. Daniel Giménez; María Silvia Tacaliti; Mariana Barragán; Ing. Agr. Erica Tocho; Dr. Ana María Castro.

E-MAIL DE LOS AUTORES: mirnaricciardi@yahoo.com.ar

PALABRAS CLAVES: Tolerancia, etileno.

PALAVRAS CHAVES: Tolerância, etileno.

INTRODUCCIÓN

La producción anual de cereales sufre constantes variaciones debido a los efectos de estreses ambientales y al ataque de diversos parásitos (Worland & Snape, 2001). Los daños causados por los diferentes tipos de estrés inducen reacciones en las plantas, entre las que se observan cambios metabólicos y/o morfológicos como, una elevada fotosíntesis, temprana senescencia y aumento en la producción de etileno (Berberet et al., 1990; Castro et al., 1996b). Muchas de las sustancias inducidas por estrés tienen efecto de tipo hormonal (ácido jasmónico, metil salicílico, ABA y etileno) y provocan alteraciones en el crecimiento y envejecimiento precoz (Castro et al., 2003b). El rol de los jasmonatos en respuesta a estreses bióticos, como insectos y patógenos, y abióticos, como daño mecánico, ha sido muy bien documentado (Baldwin et al., 1997; Baldwin & Preston, 1999; Reymond et al., 2000; Winz & Baldwin, 2001; Cipollini, 2002). Estas señales inducidas por patógenos y daños mecánicos, mediatizadas por jasmonatos, son además correguladas con otras fitohormonas (Winz & Baldwin, 2001). De igual modo la relación entre el ácido salicílico y las defensas inducidas por patógenos ha sido abundantemente documentada (Cipollini et al., 2003). Castro et al. (2001) determinaron los cromosomas de trigo que están involucrados con los distintos mecanismos de resistencia a pulgón verde y ruso. De acuerdo a estos autores los cromosomas que tienen genes de resistencia en *Triticum* son: 1A, 1D, 2B, 6A, 6D, 7A, 7B y 7D.

Durante los últimos años se ha progresado mucho en el terreno de aislar los efectos de los mecanismos de defensas de las plantas ante los diferentes tipos de estrés (Baldwin et al., 1998; Martín et al., 2003), estableciendo los costos posibles de su presencia (Cipollini, 1998, 2003; Cipollini & Bergelson, 2002, 2003), las vías metabólicas en que se basan (Agrawal et al., 2002; Shaoxing et al., 2002), así como el impacto ambiental que tienen ambos grupos de respuestas de defensas en un planteo sustentable de producción (Cipollini et al., 2003). El avance en los estudios proteómicos, ha permitido establecer que el número de componentes involucrados en los mecanismos de defensa son relativamente pocos. Esto sugeriría que ciertos genes tendrían roles dobles, en los procesos de defensa de las plantas y en otros procesos esenciales (Martín et al., 2003). Sin embargo, la función precisa de los genes relacionados con el estrés aún no es clara, aunque existe evidencia que su patrón de expresión sugiere una fuerte asociación entre su función y la tolerancia al estrés.

La selección tradicional, o asistida por marcadores, conjuntamente con técnicas de clonado y secuenciación de genes de tolerancia, específica e inespecífica, a hormonas inducidas por estrés, pondrá a disposición genes de tolerancia a diversos factores bióticos y abióticos, aumentándose la productividad de los sistemas agropecuarios a costos económicos y ecológicos reducidos. Por esto el objetivo de este trabajo ha sido identificar genes responsables de la tolerancia a etileno, en líneas doble haploides recombinantes del cromosoma 6A de trigo (*Triticum aestivum*). La identificación de los componentes genéticos de la tolerancia al estrés, es un requisito indispensable para asegurar nuevos progresos productivos por vía de la mejora genética.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

Como población de mapeo se empleó 85 líneas recombinantes doble haploides (DHR) para el cromosoma 6A, resultantes del cruzamiento entre la F1 de 'Chinese Spring' (CS) y la línea de sustitución para ese cromosoma ['CS /Synthetic 6A' (*T. diccoides* x *T. tauschii*)]. Utilizando la técnica de polinización con maíz (Ellerbrook et al. 1999) se lograron los haploides que se diploidizaron por tratamiento con colchicina. Las líneas recombinantes fueron desarrolladas en el IPK Gatersleben (Alemania), y en el John Innes Centre (BBSRC), Norwich, (Gran Bretaña).

Evaluación de la tolerancia

Semillas pregerminadas se colocaron en viales (20cc de volumen), perforados en la base, con un sustrato de vermiculita, colocando una por vial. Estos se ubicaron en bandejas conteniendo cada una 2 l de solución Hoagland, mantenidas en invernáculo bajo condiciones naturales en la primavera de 2003. Al estado de tercer hoja expandida, las plántulas del mismo genotipo se dividieron en dos grupos: control (testigos) y tratadas con etileno.

La hormona fue preparada en solución con agua destilada y Tween20 (0,01%, P/V), aplicando una dosis de 50 mM de Ethrel® por vial. Los controles fueron tratados solo con agua destilada y Tween20. Inmediatamente antes del tratamiento y a las 72 h de iniciado el mismo, se determinó área foliar (AF0 h y AF72h), tasa de crecimiento foliar (AF72h-AF0h), pesos frescos y secos aéreos (PFA, PSA) y radicales (PFR, PSR), en las plantas tratadas y en los controles. Además se calcularon las relaciones de incremento de pesos en las plantas tratadas en relación a sus testigos (PFAet/PFA; PFRet/PFR; PSAet/PFA y PSAet/PSR).

El diseño estadístico fue factorial 'genotipo * tratamiento'. Todas las variables estudiadas fueron analizadas con el paquete SAS (1998), empleando diferentes protocolos (GLM, ANOVA).

Análisis molecular

Se localizaron en el cromosoma 6A marcadores AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphisms), RFLPs (Restriction Fragments Length Polymorphisms) y microsatélites contrastantes en ambos progenitores a partir del ADN genómico extraído siguiendo la técnica de Plaschke et al. (1995). Se cribó la población de mapeo identificando su genotipo molecular y determinando así las regiones recombinantes.

Los fragmentos fueron amplificados según Röder et al. (1995). El análisis se realizó en un secuenciador fluorescente con láser automático; los tamaños de los fragmentos fueron calculados utilizando el programa computarizado, Fragment Manager Version 1.2 y por comparación con estándares internos.

Para realizar el análisis genético se empleó la función de mapeo de Kosambi (1944) y se procedió de acuerdo al programa más adecuado (MapMarker o QTL Café).

RESULTADOS

Análisis de la distribución de frecuencias de los parámetros analizados

La tasa de crecimiento del AF de las líneas recombinantes, mostró diferencias altamente significativas entre genotipos, tratamientos (etileno y testigo) y en la interacción de ambos factores (ANOVA no mostrado).

Por otro lado, tanto el PFA como el PFR, mostraron diferencias altamente significativas entre las DHR, entre tratamientos y en la interacción (ANOVA no mostrado). Las medias de peso fresco de ambos progenitores fueron similares, observándose que 23 DHR superaron significativamente, tanto el PFA como el PFR, de los padres.

Los pesos secos (PSA, PSR) de ambos progenitores no fueron significativamente distintos, sin embargo las DHR, mostraron diferencias altamente significativas entre genotipos y en la interacción (ANOVA no mostrado). Los tratamientos resultaron ser significativamente distintos sólo en el PSA.

En cuanto a las relaciones de peso seco radicales, se encontraron diferencias altamente significativas sólo entre genotipos y en la interacción (ANOVA no mostrado). Es interesante señalar que 9 recombinantes presentaron un incremento significativamente superior al del padre resistente (Syn), las que resultaron en un aumento del 65 al 125% del PSA de sus testigos (Fig. 1).

Se identificaron asociaciones significativas entre los marcadores moleculares del cromosoma 6A y la tasa de crecimiento del área foliar, el PSA, y la relación de PSR de las líneas recombinantes tratadas con sus testigos. Localizándose, para la tasa de área foliar un QTL alrededor de los 12 cM (Fig.2); para el PSA uno a los 33.5 cM (Fig.3) y para la relación del PSR de las DHR tratadas con sus controles, se identificó un QTL aproximadamente a los 20cM (Fig.4).

Figura 1. Gráfico de distribución de frecuencias de Relaciones de PSR de las líneas recombinantes tratadas con las testigo

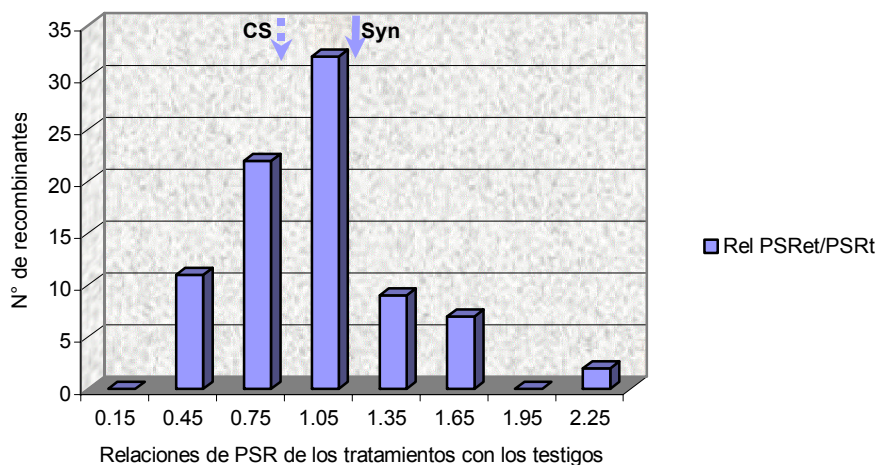


Figura 2. Análisis de ligamiento por Intervalo de Mapeo Múltiple, de los Marcadores Moleculares mapeados en el cromosoma 6A y la Tasa de crecimiento del Área Foliar

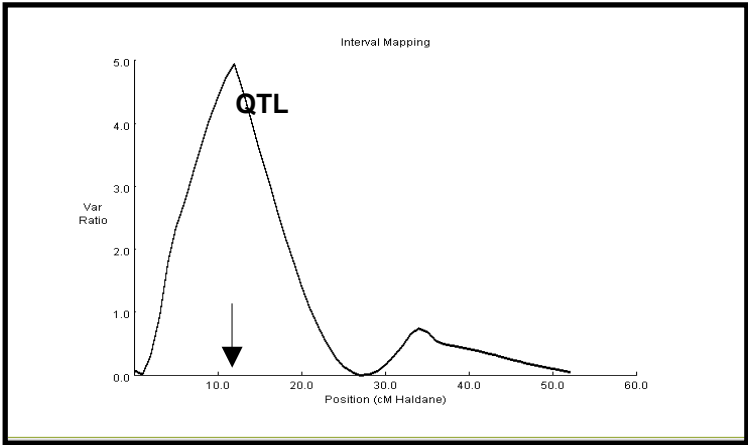


Figura 3. Análisis de ligamiento por Intervalo de Mapeo Múltiple, de los Marcadores Moleculares mapeados en el cromosoma 6A y el PSA de las DHR

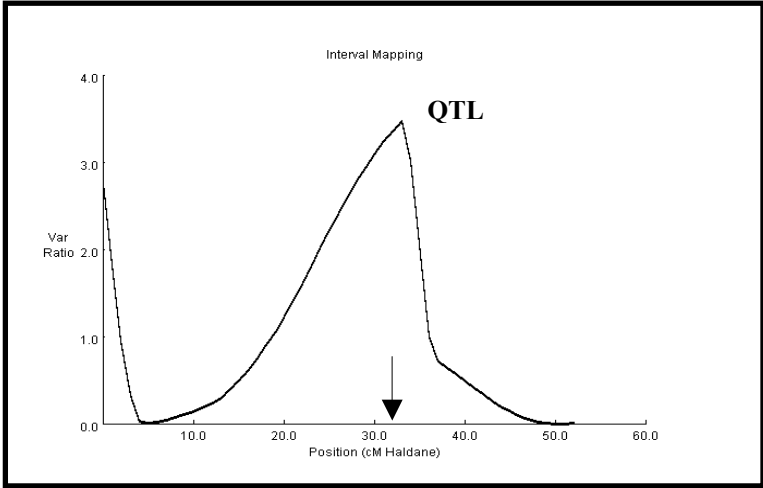
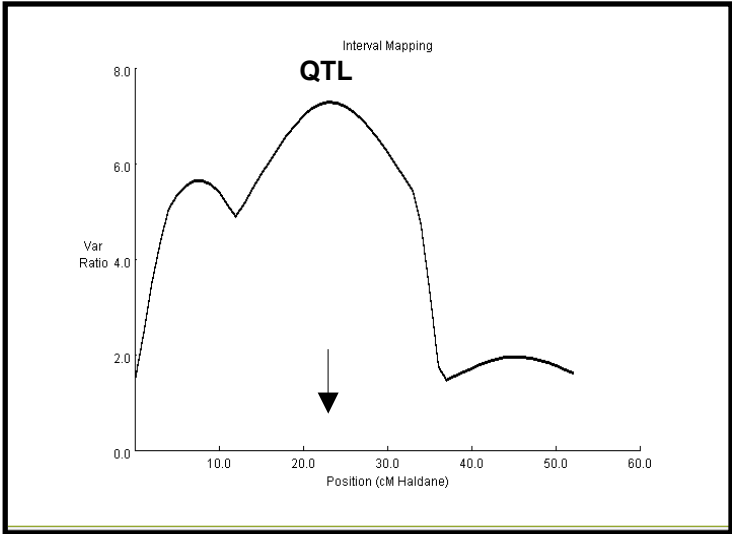


Figura 4. Análisis de ligamiento por Intervalo de Mapeo Múltiple, de los Marcadores Moleculares mapeados en el cromosoma 6A y la relación del PSR de las DHR



DISCUSIÓN

El gen localizado para la tasa de crecimiento foliar de las líneas recombinantes, sería de respuesta positiva ante el tratamiento con la hormona, determinando, cuando está presente, un aumento significativo en el área foliar.

Se sabe que el etileno causa inhibición sobre el crecimiento de las plantas (Castro et al., 1996). En nuestros ensayos, si bien se encontraron líneas recombinantes tratadas con un PFA y un PFR superior al de ambos progenitores, estos parámetros no resultaron ligados a los marcadores del cromosoma 6A.

Como consecuencia del menor peso fresco aéreo y radical, presentado por las plantas susceptibles al etileno, es de esperar una disminución del PSA y PSR en las mismas. Sin embargo, los actuales resultados muestran que mientras el PSA fue reducido por la hormona, los PSR no fueron disminuidos por la misma, siendo en este caso el metabolismo del agua el afectado. Se localizó, en las DHR, una región de respuesta positiva a los 33.5 cM para el PSA. Por otro lado, no se encontró asociación entre el PSR de las DHR y los marcadores diagnósticos.

En cuanto a las relaciones de peso seco, si bien se encontraron recombinantes que presentaron un incremento significativamente superior al de Synthetic en las relaciones de PSA, no se encontró asociación entre este parámetro y los marcadores utilizados. Por otro lado, la relación del PSR bajo tratamiento estuvo significativamente asociada con los marcadores, identificándose un QTL alrededor de los 20 cM del cromosoma 6A. Como consecuencia del efecto positivo que causa el gen encontrado para este carácter, hubo DHR que tuvieron un incremento significativamente superior al del padre resistente.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos indicarían que en el 6A de trigo existen genes que otorgan tolerancia a etileno. Estos serían de gran utilidad en el manejo sustentable de los estreses bióticos y abióticos que afectan al cultivo de trigo en nuestro país.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrawal G.**, R. Rakwal, N. Jwa & V. Agrawal. 2002. Characterization of a novel rice gene and modulation of its expression by components of the stress signalling pathways. *Physiologia Plantarum* 116: 87-95.
- Baldwin I.T.**, Z. Zhang, N. Diab, T. Ohnmeiss, E. McCloud, G. Lynds & E. Schmelz. 1997. Quantification, correlations and manipulations of wound-induced changes in jasmonic acid and nicotine in *Nicotiana sylvestris*. *Planta* 201: 397-404.
- Baldwin I.T.**, D. Gorham, E.A. Schemelz, C.A. Lewandowski & G.Y. Lynds. 1998. Allocation of nitrogen to an inducible defense and seed production in *Nicotiana attenuata*. *Oecologia* 115: 541-552.
- Baldwin I.T. & C.J. Preston.** 1999. The ecophysiological complexity of plant responses to herbivores. *Planta* 208: 137-145.
- Berberet R.C.**, J.L. Caddel & J.W. Dillwith. 1990. Induction of ethylene production in alfalfa by aphid feeding. In: Proc. Aphid-plant interactions: populations to molecules. D.C. Peters, J.A. Webster y C.S. Chlouber (eds.). Stillwater, Oklahoma. 296 pp.
- Castro A.M.**, D. Giménez, G. Brocchi, L. Almaraz, & E. Montaldi. 1996a. Ethylene: a new tool for breeding tolerance to aphids in cereals?. In: Techniques in Plant-Insect Interactions and Biopesticides, H.M. Niemeyer (ed.). International Foundation for Science (IFS), Stockholm, Sweden. ISBN 91 85798 42 8. pp: 152-157.
- Castro A.M.**, S. Ramos, A. Vasicek, A.J. Worland, D.O. Giménez, A.A. Clúa, & E. Suárez. 2001. Identification of wheat chromosomes involved with different types of resistance against greenbug (*Schizaphis graminum*, Rond.) and the Russian wheat aphid (*Diuraphis noxia*, Mordvilko). *Euphytica* 118: 321-330.
- Castro A.M.**, A. Clúa, D.O. Giménez, E. Tocho, M.S. Tacaliti, A. Worland, E. Sayers, H. Chidichimo & J. Snape. 2003b. Chromosomal effects on tolerance to the stress-induced hormones ethylene, jasmonic acid, salicylic acid and ABA in wheat (*Triticum aestivum*) substitution lines. In Pogna N. Wheat Genetic Symposium. Viterbo. Italia. Vol 3, pp: 1111-1114.
- Cipollini D.F.** 1998. Induced defenses and phenotypic plasticity. *Trends in Ecology and Evolution* 13: 200 pp.

- Cipollini D.F.** 2002. Does competition magnify the fitness costs of induced responses in *Arabidopsis thaliana*? A manipulative approach. *Oecologia* 131: 514-520.
- Cipollini D.F. & Bergelson R.** 2002. Plant density and nutrient availability constrains constitutive and wound induced expression of trypsin inhibitors in *Brassica napus*. *J. Chem. Ecology* 27: 593-610.
- Cipollini D.F., C.B. Purrington. & Bergelson J.** 2003. Costs of induced responses in plants (comunicación personal).
- Ellerbrook C., V. Korzun & A.J. Worland.** 1999. Using precise genetic stocks to investigate the control of *Stagnospora nodorum* resistance in wheat. In: M. Van Ginkel, A. McNab, & J. Krupinsky (eds), *Septoria and Stagnospora nodorum diseases of cereals: a compilation of global research*. CIMMYT, Mexico DF. pp:134-139.
- Martín G.B., A. Bogdanove & G. Sessa.** 2003. Understanding the functions of plant disease resistance proteins. *Ann. Rev. Plant Biol.* 54: 23-61.
- Plaschke J., M.W. Ganal & M. Röder.** 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl. Genet.* 91: 1001-1007.
- Reymond P., H. Weber, M. Damond & E.E. Farmer.** 2000. Differential gene expression in response to mechanical wounding and insect feeding in *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 12: 707-720.
- Röder M. S., J. Plaschke, S. U. König, A. Börner, M. E. Sorrells, S. D. Tanksley & M. W. Ganal.** 1995. Abundance, variability and chromosome location of microsatellites in wheat. *Mol. Gen. Genet.* 246: 327-333.
- Shaoxing H., A. Sirikhachornkit, X. Su, J. Faris, B. Gill, R. Haselkorn & P. Gornicki.** 2002. Phylogenetic analysis of the acetyl-CoA carboxylase and 3-phosphoglycerate kinase loci in wheat and other grasses. *Plant Mol. Biol.* 48: 805-820.
- Winz R. & I. Baldwin.** 2001. Molecular interactions between the specialist herbivore *Manduca sexta* (Lepidoptera, Sphingidae) and its natural host *Nicotiana attenuata*. IV. Insect-induced ethylene reduced jasmonate-induced nicotine accumulation by regulating putrescine N-methyltransferase transcripts. *Plant Physiol.* 125: 2189-2202.
- Worland A.W. & J.W. Snape.** 2001. Genetic Basis of Worldwide adaptability of wheat varietal improvement. In W.J. Angus and A. Bonjeau. (eds). *The World Wheat Book: A history of wheat breeding*. Lavoisier Publishing, Paris. pp 59-100.